

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE — N° 207

*Travail du Laboratoire de Chimie Biologique et Médicale
et du Laboratoire de Parasitologie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES
VARIATIONS DE LA RÉACTION
DES MILIEUX DE CULTURE
SOUS L'INFLUENCE DES MICROORGANISMES

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
SECTION DE PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 30 Juin 1934

PAR

Georges LAFAY

DIPLÔMÉ DE BACTÉRIOLOGIE

Né à Beaujeu, le 8 octobre 1906



IMPRIMERIE DE TRÉVOUX
G. PATISSIER

1934

Contribution à l'étude
DES VARIATIONS DE LA REACTION
DES MILIEUX DE CULTURE
sous l'influence des microorganismes

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE — N° 207

*Travail du Laboratoire de Chimie Biologique et Médicale
et du Laboratoire de Parasitologie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES
VARIATIONS DE LA RÉACTION
DES MILIEUX DE CULTURE
SOUS L'INFLUENCE DES MICROORGANISMES

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
SECTION DE PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 30 Juin 1934

PAR

Georges LAFAY

DIPLÔMÉ DE BACTÉRIOLOGIE

Né à Beaujeu, le 8 octobre 1906



IMPRIMERIE DE TRÉVOUX
G. PATISSIER

1934

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire ... M. L. HUGOUNENQ

Doyen ... M. J. LEPINE

Assesseur ... M. A. MOREL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ROQUE, LANNOIS, HUGOUNENQ, ROCHET, BARRAL, ROLLET, DOYON

PROFESSEURS

Cliniques médicales	MM. PIC
Cliniques chirurgicales	PAVLOT
Clinique obstétricale et Accouchements	FIXIER
Clinique ophtalmologique	BERARD
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	VORON
Clinique neurologique et psychiatrique	BONNET
Clinique des maladies des enfants	NICOLAS
Clinique des maladies des femmes	LEPINE (J.)
Clinique d'oto-rhino laryngologie	MOURIQUAND
Clinique des maladies des voies urinaires	VILLARD
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie	COLLET
Clinique et prophylaxie de la tuberculose	GAYET
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie	NOVE-JOSSERAND
Chimie biologique et médicale	COURMONT
Chimie organique et Toxicologie	CLUZET
Matière médicale et Botanique	FLORENCE
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	MOREL
Anatomie	MANCEAU
Histologie	GUIART
Physiologie	LATARJET
Pathologie externe	POLICARD
Pathologie interne	HERMANN
Pathologie et Thérapeutique générales	LERICHE
Anatomie pathologique	FROMENT
Chirurgie opératoire	CADE
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie	FAVRE
Médecine légale	PATEL
Hygiène	ARLONG (F.)
Thérapeutique	ETIENNE MARTIN
Pharmacie et Pharmacologie	ROCHAIX
Hydrologie thérapeutique et climatologie	SAVY
	LEULIER
	PIERY

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Propédeutique de gynécologie	MM. CONDAMIN
Chargé d'un cours d'Anatomie médico-chirurgicale	THEVENOT (Léon)
Chargé d'un cours d'Embryologie	NOEL

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Chirurgie expérimentale	MM. TAVERNIER
Stomatologie	PONT

AGRÉGÉS

MM.	MM.	MM.	MM.
MAZEL	WERTHEIMER	EPARVIER	CREYSSSEL
DUMAS	GATE	GUILLEMINET	DE ROUGEMONT
DUFOURT	DECHAUME	MORENAS	PAUPERT-RAVAULT
DEVIC	BERNHEIM	REBATTU	PIGEAUD
GABRIELLE	POLLOSSON	REVOL	PONTHUS
MARTIN (Joseph)	CHAMBON	ENSELME	MALMEJAC
ROCHET (Ph.)	CIBERT	SEDALLIAN	

Examineurs de la Thèse :

M. G. FLORENCE, *Président*.

MM. MORENAS, REVOL et ENSELME, *Assesseurs*.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.



A MON PÈRE, A MA MÈRE

A MA FEMME

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. FLORENCE

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

A MES JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR MORENAS

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ REVOL

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ ENSELME

A MON CHER MAÎTRE DE STAGE

MONSIEUR ÉDOUARD BRIDON

DOCTEUR EN PHARMACIE

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ

AVANT-PROPOS

Avant d'aborder notre sujet, c'est un devoir bien agréable pour nous d'exprimer ici toute notre reconnaissance aux Maîtres qui nous ont guidé.

C'est au Laboratoire de Chimie Biologique et Médicale, et sous la direction de M. le Professeur G. FLORENCE, que nous avons eu l'avantage d'effectuer nos recherches et nos mesures. Nous avons trouvé en lui un maître ne refusant jamais ni conseils ni encouragements. Il nous a mis au courant des techniques délicates employées en physicochimie, et nous a toujours reçu avec la plus grande bonté dans son laboratoire, où nous avons profité d'une installation de tout premier ordre. Nous l'en remercions bien vivement et le prions d'agréer l'expression de notre plus respectueuse gratitude pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant la présidence de cette thèse.

M. le Professeur MORENAS nous a guidé dans notre travail avec la plus grande bienveillance et nous fait

l'honneur d'être notre juge aujourd'hui, qu'il veuille trouver ici l'expression de notre reconnaissance.

Nous remercions bien vivement M. le Professeur agrégé ENSELME et M. le Professeur agrégé REVOL pour avoir accepté de faire partie de notre jury.

Nos remerciements s'adressent encore à M. le Docteur MASSIA pour son assistance éclairée et toujours bienveillante qui a facilité nos travaux ; et à M. le Professeur VLÉS, de Strasbourg, qui a bien voulu nous conseiller pour l'établissement et l'interprétation de nos courbes.

INTRODUCTION

La détermination du pH des milieux de culture rendue facile par l'emploi des méthodes colorimétriques est devenue une opération courante dans les laboratoires de microbiologie ; et la connaissance précise des pH limites et du pH optimum de culture pour chaque espèce de microorganisme est indispensable pour la préparation des milieux ; aussi, de nombreuses études ont été faites sur l'influence exercée par la réaction du milieu sur la culture des microorganismes.

Mais il est d'observation banale que la réaction d'un milieu dans lequel se développe un microbe ou une moisissure est un objet de variations continuelles, et ces variations étant l'image des transformations chimiques qui résultent de la nutrition et du développement du microbe ou de la moisissure, puis de sa dégénérescence, leur étude est importante.

Ces phénomènes d'acidification et d'alcalinisation dépendent de la nature du milieu et du microorganisme qui y pousse, et chacun sait que cette constatation est

utilisée dans la pratique bactériologique courante pour le diagnostic sur milieux sucrés tournesolés de certaines espèces bactériennes : le groupe Coli-Eberth entre autres.

Nous avons entrepris sur les conseils et d'après les directives de Monsieur le Professeur G. FLORENCE, de suivre les variations du pH et du pouvoir tampon de quelques milieux de culture en étudiant les variations des courbes de neutralisation et de coefficient tampon de ces milieux, au fur et à mesure du développement de certains champignons inférieurs.

Pour toutes les mesures de pH que nécessite l'établissement de ces courbes, nous avons utilisé la précieuse technique de l'électrode d'antimoine de VLÈS.

Notre étude a porté plus spécialement sur deux champignons : l'*Aspergillus niger* et le *Penicillium glaucum* ensemencés sur liquide de Raulin classique puis sur liquide de Raulin modifié.

Plan suivi dans ce travail

I. INTRODUCTION

II. HISTORIQUE

Etude des variations de la réaction des milieux de culture.

III. RECHERCHES PERSONNELLES

Culture des moisissures sur Raulin.

Mesure électrique du pH.

Courbes de neutralisation et de pouvoir tampon.

Technique générale employée.

Variation des courbes au cours des cultures.

IV. CONCLUSIONS

V. BIBLIOGRAPHIE

Historique

Etude des variations de la réaction des milieux de culture

Depuis les premiers travaux de Pasteur sur les fermentations, d'innombrables chercheurs ont étudié le métabolisme des divers aliments offerts aux microorganismes et le processus des différentes fermentations. Parmi ces études, un certain nombre se rapportent aux champignons inférieurs et nous intéressent plus spécialement, nos expériences ayant été faites surtout avec *Aspergillus Niger* et *Penicillium glaucum*. Au début, on s'est principalement occupé de rechercher quelles étaient les formes les plus assimilables des aliments sans étudier les changements intervenus dans les liquides de culture. Pasteur, cependant, avait bien remarqué l'importance de la réaction et de ses variations au cours

des fermentations, et il exprime ainsi le résultat de ses observations à ce sujet : « La levure de bière agit fort mal au milieu d'une liqueur alcaline ; le plus souvent, elle y est arrêtée. Elle est également gênée par une acidité même très minime, contrairement à ce qui est admis généralement. C'est d'un milieu neutre qu'elle s'accommode le mieux, mais comme dans toute fermentation alcoolique ordinaire il se forme des acides, il y a une cause permanente de ralentissement de son action ». Mais la notion de force d'un acide et celle de la neutralité n'avaient pas à cette époque l'exactitude et l'importance qu'elles ont maintenant, et les auteurs anciens n'avaient pas à leur disposition les méthodes si précises que nous donne aujourd'hui la physico-chimie.

Raulin démontre l'influence de certains éléments : cuivre, fer, zinc, sur le rendement des cultures d'*Aspergillus Niger*, et réalise un milieu de culture chimiquement défini, devenu classique, et qui convient pour la plupart des moisissures.

Lutz, puis Czapeck, étudient surtout les aliments azotés et comparent leur assimilabilité en faisant des cultures sur des milieux dans lesquels l'azote est offert successivement, sous forme de sels ammoniacaux, d'amines, d'amides et de nitriles, et en mesurant le rendement.

Mais, dès 1896, Kahlenberg et True (1) font remarquer qu'une grande part de l'activité physiologique des

(1) KAHLENBERG et TRUE. *Bot. Gazette*, 22, p. 81, 1896.

solutions électrolytiques revient aux ions libres et leurs expériences effectuées sur des radicelles de Lupin montrent que les acides minéraux sont très toxiques, leur toxicité étant en rapport avec la quantité d'ions H présents dans la liqueur, tandis que l'acide acétique et ses homologues, malgré leur faible dissociation, ont une toxicité très élevée due principalement aux molécules non dissociées. Ces résultats furent confirmés quelques années plus tard par Clark (1) qui étudia le développement des spores de cinq moisissures différentes, dans un milieu additionné de quantités croissantes d'acides minéraux ou organiques. En utilisant les acides mono-, di- et trichloracétique, il constata que l'acide trichloracétique n'est pas plus toxique que l'acide acétique, bien que l'introduction d'un atome de chlore dans la molécule augmente la toxicité moléculaire ; c'est que, d'autre part, la dissociation s'élève de l'acide acétique à l'acide trichloracétique et, par suite, la proportion des molécules non dissociées se trouve diminuée.

Beaucoup d'auteurs ont recherché quelle était l'influence de la réaction des milieux sur le développement des champignons et sur la production des spores, et l'on a pu déterminer les zones de pH limite et les zones de pH optimum pour la plupart des champignons ; il y a de grandes différences selon les espèces étudiées, mais, en général, les champignons poussent mieux en milieu acide qu'en milieu neutre ou alcalin, et la production des spores n'est arrêtée que par une assez forte acidité.

(1) CLARK (J.-F.). *Bot. Gazette*, 28, pp. 289 et 378, 1899.

Ritter a observé la formation de cellules géantes dans les cultures de Mucorinées ; leur apparition est liée à la présence des acides, soit que ceux-ci préexistent dans le milieu, soit qu'ils se forment au cours de l'assimilation des sels ammoniacaux ; ces acides interviennent par la concentration des ions H qu'ils peuvent fournir et toute cause capable de diminuer leur dissociation empêche l'apparition des cellules géantes.

D. Bach a pu déterminer qu'avec *Aspergillus Repens* ces cellules géantes apparaissent à partir de pH4, et leur proportion va en augmentant ; à partir de pH3 toute la culture est formée de ces cellules.

L'influence de la quantité d'ions H ou OH mis en liberté dans un milieu de culture apparaît donc très importante. Mais la réaction du milieu se trouve modifiée constamment au cours de la vie du champignon ; le sens de cette modification pour un organisme déterminé dépend de la composition chimique du milieu, de la réaction initiale, de l'âge de la culture et son amplitude est surtout déterminée par le pouvoir tampon du milieu. Ces changements de réaction au cours de la culture des champignons inférieurs ont été l'objet de nombreux travaux.

D. Bach (1) en 1925 dans une thèse où il étudie plus spécialement la nutrition azotée de l'*Aspergillus Repens* de Bary, en a donné une bibliographie critique très documentée, dans laquelle nous avons puisé largement pour établir l'historique de cette question.

(1) D. BACH. *Thèse de la Faculté des Sciences de Paris*, 1925.

I. CAUSES D'ACIDIFICATION

Tanret et Wehmer les premiers, ont signalé la formation d'acide nitrique au cours de l'assimilation du nitrate d'ammoniaque. Puis Butkewitsch fit la même constatation pour les sels ammoniacaux minéraux dont les acides sont mis en liberté au cours de l'assimilation de l'ammoniaque. Il y a là en effet une des principales causes de l'acidification des milieux de culture et l'acidité produite peut rapidement devenir mortelle pour le champignon, comme Wehmer le fit remarquer en ce qui concerne le *Penicillium* variable.

Nikitinsky, dans des recherches entreprises sur l'influence des produits du métabolisme de l'*Aspergillus Niger* sur la culture ultérieure du champignon, montre qu'en présence d'un excès de sucre, l'effet toxique des vieilles cultures est dû uniquement à l'accumulation de l'acide du sel ammoniacal utilisé ; en neutralisant cet acide, on peut obtenir des cultures successives très importantes. D'autre part, dans un mélange de NH_4Cl et tartrate d'ammoniaque, l'acide tartrique diminuant la dissociation de HCl produit, la valeur du pH n'atteint pas la zone limite de végétation, et l'on peut, sans neutralisation, faire une série de cultures sur le même milieu. Hagem montre que les Mucorinées ne peuvent supporter une acidité élevée, et que les sels ammoniacaux minéraux ne leur conviennent que si on neutralise l'acide libéré par CO_2Ca .

Ritter expérimenta, avec *Aspergillus glaucus* de Barry, *Cladosporium herbarum* Link., *Mucor racemosus* Fres., champignons qui, d'après Laurent, préfèrent les nitrates, mais qui, en réalité, ne peuvent supporter de fortes doses d'acides libres comme il s'en produit au cours de l'assimilation du sulfate d'ammoniaque ; en remplaçant le sulfate par le phosphate, il y a mise en liberté d'acide phosphorique, acide faible peu dissocié et qui permet, avec *Aspergillus Glaucus*, par exemple, une culture plus abondante que le nitrate de sodium.

D. Bach, étudiant l'assimilation de l'ion ammoniacal avec *Aspergillus Repens* arrive aux conclusions suivantes : « Dans le cas des sels ammoniacaux des acides forts, l'acidification des cultures est la seule cause de la mauvaise utilisation de l'ion ammoniacal. Cette acidification est due uniquement à la mise en liberté de l'acide minéral ». Ses expériences montrent, en effet, que le sulfate d'ammoniaque est un aliment sensiblement supérieur au chlorhydrate, l'acide sulfurique étant moins dissocié que l'acide chlorhydrique ; le champignon peut donc consommer une dose de sel ammoniacal plus élevée avec le sulfate qu'avec le chlorhydrate avant d'atteindre le pH limite, et, par suite, fournir une récolte plus abondante. Ces mêmes milieux, stabilisés par addition de citrate de soude, donnent aussi des récoltes supérieures.

Le même auteur étudie successivement le phosphate acide d'ammoniaque, l'acétate, le propionate et le butyrate d'ammoniaque, puis les sels ammoniacaux des acides bibasiques, de l'acide oxalique à l'acide subérique, et enfin les sels ammoniacaux des acides-alcools ;

il en conclut que « les sels ammoniacaux des acides faibles ont une valeur alimentaire élevée toutes les fois que l'acide n'est pas toxique ». En ce qui concerne les sels ammoniacaux des acides gras monobasiques, ils peuvent être de bonnes sources d'azote, mais leur toxicité et leur valeur alimentaire, également remarquables, sont sous la dépendance étroite de la réaction du milieu. Cela tient au fait parfaitement établi que les molécules non ionisées des acides gras ont un pouvoir toxique élevé ; c'est pourquoi les solutions d'acides gras dont la dissociation est faible sont très toxiques tandis que les solutions des sels correspondants ne le sont pas, en raison de leur ionisation presque complète. L'alcalinisation diminue donc la toxicité par la formation de sels, tandis que l'acidification l'exalte en libérant les acides.

Les sels ammoniacaux d'acides bibasiques, en raison de leur faible dissociation et de la non toxicité de la molécule non ionisée, se sont montrés d'excellents aliments, exception faite, toutefois, pour l'oxalate d'ammoniaque, l'acide oxalique étant très dissocié et doué d'une grande toxicité.

Enfin, avec les sels d'acides-alcools, le développement de l'*Aspergillus Repens* est rapide et le milieu s'acidifie par la mise en liberté de l'acide du sel ammoniacal, la variation du pH est d'ailleurs amortie par le pouvoir tampon de ces acides. D'ailleurs, dans toutes ces cultures, Bach constate que l'acidification des milieux, une fois établie à un niveau élevé, ne s'y maintient pas toujours, car, lorsque ces acides formés ont une molécule assimilable, il y a régression du pH au

fur et à mesure de leur consommation par le champignon ; mais cette consommation des molécules acides est réglée par les proportions de sucre que renferme le milieu : le champignon utilisant d'abord le sucre comme aliment carboné avant d'attaquer la molécule organique des acides.

Toutes ces expériences mettent donc bien en évidence le mécanisme de l'acidification des cultures au cours de l'assimilation des sels ammoniacaux, et l'importance du pouvoir tampon qui permet l'utilisation, par exemple, des sels ammoniacaux d'acides forts sans que l'acidité ionique du milieu s'élève jusqu'à arrêter la végétation et qui, dans tous les cas, augmente le rendement des cultures.

L'influence de la consommation des acides aminés sur la réaction du milieu est plus difficile à analyser. Czapeck prétendait que l'aminoacide était la forme obligatoire de l'assimilation de l'azote ; l'absorption de ces corps ne devait donc entraîner aucun changement de réaction ; cette opinion fut admise jusqu'aux expériences de Boas qui fit une critique très serrée de la théorie de Czapeck et de sa technique. Boas démontra en effet, que l'aminoacide pour être utilisé doit subir une désamination préalable avec formation d'ammoniaque qui, en définitive, est la forme obligatoire d'assimilation de l'azote. Boas et Leberle (1) emploient la méthode suivante : se basant sur l'acidification élevée qui accompagne la consommation du sulfate d'ammoniaque, ils suivent la variation du pH dans des cultures

(1) BOAS und LEBERLE. *Bioch. Zeits.*, 92, p. 130, 1919.

avec sulfate d'ammoniaque seul, puis additionné d'acétamide ou de peptone, et dans les trois cas, ils obtiennent des courbes identiques ; malgré les conditions défavorables créées par la consommation de l'ion ammoniacal, l'organisme ne s'attaque qu'à lui

Bach, qui étudie la question à son tour, donne les mêmes conclusions, mais si la désamination entraîne la mise en liberté d'un reste acide, il ne s'en suit pas forcément une grande variation du pH vers l'acidité, car le phénomène est complexe et variable suivant les conditions : pH initial, nature de la source de carbone, et puis la régression du pH est rapide par suite de la consommation de la molécule acide et de la formation d'ammoniaque de désamination et de protéolyse.

L'assimilation de l'urée et de la peptone en présence de sucre se traduit également par une légère acidification au début.

Mais une autre cause importante d'acidification réside dans la consommation des sucres qui donne lieu à la formation d'acides organiques : cette acidification est plus ou moins intense et variable suivant la nature du sucre, comme l'ont montré Boas et Leberlé.

Les acides les plus couramment isolés sont l'acide oxalique, l'acide citrique, l'acide succinique, l'acide gluconique. Les recherches de Molliard (1) sur le *Sterigmatocystis Nigra* ont montré que leur apparition était liée, avant tout, à la composition de l'aliment minéral et que l'on pouvait à volonté produire tel ou tel d'entre eux.

(1) MOLLIARD. *C. R. Ac. Sc.*, 168, p. 360, 1919.

Butkewitsch (1), étudiant la formation d'acides chez les champignons, arrive aux mêmes conclusions et montre que l'acide gluconique est chez les Aspergillacées un produit ordinaire de l'oxydation du sucre au même titre que l'acide citrique et l'acide oxalique. En faisant des cultures sur du sucre, avec un manque relatif d'azote et en présence de carbonate de calcium, on obtient plus d'acide gluconique que de n'importe quel autre acide. Dans les mêmes conditions, on ne trouve dans les cultures de *Mucor Stolonifer* que de l'acide fumarique et de l'acide oxalique.

Le terme final de la combustion des sucres est CO^2 et ces acides qui sont le résultat d'une combustion incomplète, apparaissent comme des étapes dans cette transformation ; mais il est souvent difficile de déceler toutes les phases successives de cette modification. Beaucoup d'auteurs se sont attachés à ce problème délicat ; citons les travaux de Bernhauer (2) qui étudie spécialement les processus de formation des acides par *Aspergillus Niger* ; ceux de Wehmer sur les transformations des sucres par diverses moisissures. En 1927, Challenger, Subramanian et Walker (3), étudiant le mécanisme de la formation des acides citrique et oxalique, à partir des sucres, par *Aspergillus Niger* ont pu mettre en évidence un certain nombre des produits intermédiaires dans cette transformation ; ils emploient

(1) BUTKEWITSCH. *Bioch. Zeit.*, 182, pp. 99-109, 1927.

(2) BERNHAUER. *Bioch. Zeits.*, 172, pp. 296-349, 1926.

(3) CHALLENGER, SUBRAMANIAN et WALKER. *Chem. Soc.*, t. 131, pp. 200-208 et pp. 3044-3054.

un milieu qui renferme les sels suivants : NO^3NH^4 0,356, $\text{PO}^4\text{H}^2\text{K}$ 0,68, SO^4Mg 0,08, SO^4Fe 0,0045, SO^4Zn 0,0046 ; d'après ces recherches, il semble que la transformation s'effectue de la façon suivante : glucose $\rightarrow$ acide gluconique $\rightarrow$ acide saccharique $\rightarrow$ acide dicéto-adipique $\rightarrow$ acide citrique $\rightarrow$ **acide acétone-dicarbonique** $\rightarrow$ acides malonique et acétique $\rightarrow$ acide acétique (2 molec.) $\rightarrow$ acide glycollique $\rightarrow$ acide glyoxylique $\rightarrow$ acide oxalique.

Mais en dehors de la production de ces acides résultant de la dégradation des sucres, il faut noter la formation d'acide oxalique qui, d'après Molliard (1), résulte chez les végétaux d'une réaction des cellules vis-à-vis d'une tendance à l'alcalinité du milieu nutritif. Cette loi très simple, mise en évidence par une série de cultures effectuées avec le *Sterigmatocystis Nigra*, explique par une sorte de réflexe chimique ce fait banal, mais très remarquable, consistant en ce que le milieu nutritif reste toujours acide, quelle qu'en soit la composition initiale.

Bach fait les mêmes observations et étudie les phénomènes avec plus de précision. L'acide oxalique se forme, en effet, chaque fois que le champignon doit lutter contre une alcalinisation du milieu, c'est ainsi qu'il n'apparaît pas en présence de sels ammoniacaux, alors qu'il se forme rapidement avec le nitrate de potassium dont l'utilisation par le champignon a pour conséquence l'accumulation de KOH. Avec les autres sour-

(1) MOLLIARD. *C. R. Soc. Biol.*, 82, p. 351, 1919.

ces d'azote, on le voit apparaître en période d'autolyse. Dans le cas du nitrate de potassium, l'auteur constate que l'acide oxalique cesse de se montrer entre pH5 et pH4, c'est pourquoi, quelle que soit la réaction initiale, les milieux convergent tous vers cette zone de pH et l'acide est d'autant plus abondant que le milieu est plus alcalin et la culture plus développée.

II. CAUSES D'ALCALINISATION

Les phénomènes d'acalınisation relèvent de causes plus nombreuses et plus complexes encore que les phénomènes d'acidification. Toutefois, les deux causes les plus générales d'alcalinisation des cultures résident dans la consommation des molécules acides préexistantes ou issues de la combustion incomplète du sucre et dans l'accumulation de l'ammoniaque issue de la protéolyse.

Comme nous l'avons déjà signalé à propos des travaux de Bach sur l'assimilation des sels ammoniacaux des acides organiques, la libération des acides, par suite de l'utilisation de l'ammoniaque, ne fait pas toujours atteindre à la culture une acidité élevée permanente, mais il se produit le plus souvent une régression de pH due à la consommation des molécules acides. Ce phénomène avait été signalé par plusieurs auteurs.

Kiesel (1) entre autres, en 1913, a fait l'observation

(1) KIESEL. *Ann. Inst. Pasteur*, 27, p. 391, 1913.

suivante : avec les sels ammoniacaux d'acides inassimilables, l'acidité que peut réaliser l'*Aspergillus Niger*, une fois obtenue, se maintient constante, le champignon n'ayant pas le moyen de se défendre contre l'accumulation des acides. Par contre, avec les sels ammoniacaux d'acides à radical assimilable, l'acidité limite atteinte diminue ensuite en raison de la consommation par le végétal de l'acide libéré au cours de la première phase.

Puis Ayers et Ruff font une étude plus précise de la question. Les Bactéries du groupe B. OÉrogènes font fermenter énergiquement le dextrose avec transformation partielle en acides organiques parmi lesquels les auteurs ont caractérisé l'acide formique. La réaction passe donc de pH 7,5 à pH 5,3, puis le formiate est attaqué et le pH revient rapidement vers 7. Avec un mélange dextrose + formiate ou dextrose + citrate, l'acidification initiale est peu intense, mais elle est suivie d'une alcalinisation profonde due à la consommation des radicaux organiques acides.

Bach a mis ces faits en évidence au cours de ses nombreuses expériences. Les acides organiques qu'il a étudiés se comportent de façon assez différente. Ceux de la série acétique sont attaqués rapidement même en présence de sucre, et il s'ensuit une légère alcalinisation au début de la culture ; la plupart des acides, au contraire, ne sont utilisés que lorsque la proportion du sucre a notablement diminué, on peut suivre l'amplitude de ce phénomène en observant les variations du pouvoir tampon. Avec l'acide malique, il y a une attaque précoce et la culture est ramenée, dès le début, dans la zone neutre où la croissance est peu active. Avec les

acides inassimilables comme l'acide oxalique et l'acide mucique, le pouvoir tampon ne diminue pas et le pH ne subit pas de régression de grande amplitude.

La seconde cause importante d'alcalinisation se trouve dans la formation d'ammoniaque par la protéolyse du mycélium lui-même. Ce dernier, après avoir consommé l'aliment énergétique mis à sa disposition, continue à vivre aux dépens de sa propre substance. On se rend compte de l'apparition du phénomène en observant le mycélium qui se colore, ainsi que le liquide, en vert ou en brun verdâtre de plus en plus foncé ; il y a également diminution du poids du mycélium et augmentation de l'ammoniaque qui s'accumule parce que la consommation du carbone est beaucoup plus forte que celle de l'azote ; mais le début exact de ces phénomènes de protéolyse est difficile à déceler parce qu'ils commencent souvent de bonne heure, bien avant que les phénomènes d'édification des tissus ne soient arrêtés par l'épuisement du milieu. La protéolyse peut s'exercer dans une zone très étendue de l'échelle des pH, mais elle est maximum dans la zone neutre ou alcaline ; Bach a pu déterminer que la protéolyse est nulle lorsque la réaction est très acide et que la zone la plus favorable commence à pH5. L'augmentation du pH, produite par l'ammoniaque de protéolyse, est de faible importance quand on la compare à celle qui est le fait de la consommation des radicaux acides.

Enfin, on observe aussi l'alcalinisation au cours de l'assimilation de certaines substances telles que les nitrates alcalins, l'urée, la peptone.

Dans le cas des nitrates alcalins, l'ion nitrique ser-

vant de source d'azote, il y a mise en liberté de bases et diminution rapide de la concentration des ions H : c'est l'inverse de ce qui se produit au cours de l'assimilation de l'ammoniaque des sels ammoniacaux ; mais cette alcalinisation aurait vite arrêté la croissance du champignon en le plaçant dans une zone de pH défavorable, si celui-ci ne se défendait pas par la production d'acide oxalique de neutralisation, étudié par Molliard et Bach, et dont nous avons déjà parlé plus haut. Bach fait remarquer que, sur les milieux nitrates acides, le mycélium croît assez rapidement, il a le temps de se développer suffisamment avant que le milieu ne soit à un pH défavorable, et, lorsque ce pH est atteint, il se trouve en quantité suffisante pour produire l'acide oxalique de neutralisation ; sur les milieux neutres ou alcalins, au contraire, le mycélium végète au début, parce que les causes d'alcalinisation et d'acidification se contrebalancent jusqu'à ce que le mycélium puisse acidifier le milieu.

Le nitrate d'ammoniaque présente un intérêt particulier, du fait que la même molécule renferme l'azote nitrique et l'azote ammoniacal. La plupart des auteurs qui se sont occupés du problème de savoir quelle est la forme que le champignon préfère, ont trouvé qu'il consomme d'abord l'azote ammoniacal et ne s'attaque à l'azote nitrique qu'en dernier lieu.

Ritter, en particulier, avec *Aspergillus Niger*, a trouvé que la consommation de l'ion nitrique était réglée par la dose de nitrate d'ammoniaque employée. Avec de fortes doses (1,68 %), l'ion ammoniacal est consommé presque seul, l'acidité s'élève fortement et la culture

s'arrête ; avec des doses plus faibles (0,42 %), la consommation intégrale de l'ammoniaque n'amenant pas le champignon hors de la zone favorable, le développement continue aux dépens de l'ion nitrique ; le milieu ne s'alcalinise pourtant pas, car il se produit, à ce moment, de fortes quantités d'acide oxalique qu'on ne retrouve pas dans le cas précédent.

Bach, avec *Aspergillus Repens*, trouve, au contraire, que ce champignon attaque énergiquement l'ion nitrique en présence d'ammoniaque et d'une façon aussi précoce. Cependant, la consommation respective des deux formes semble réglée dans une certaine mesure par la réaction initiale. Dans les milieux acides (pH 3,6), la consommation de l'ion nitrique, cause d'alcalinisation, l'emporte sur celle de l'ion ammoniacal, cause d'acidification. Dans les milieux peu acides ou alcalins (pH5 et pH8), la consommation de l'ion ammoniacal est le phénomène prédominant.

Il y a donc dans la faculté d'attaque des champignons à l'égard de ces deux formes d'azote, des différences tout au moins quantitatives.

Avec l'urée, comme avec les nitrates, il se produit une alcalinisation plus ou moins masquée par la production d'acide oxalique.

Avec la peptone, l'alcalinisation est rapide et intense, surtout en l'absence de sucre, mais la réaction est maintenue près de la neutralité par la formation d'acide oxalique.

Butkewitsch, étudiant la formation d'acide oxalique et d'ammoniaque dans les cultures d'*Aspergillus Niger* sur peptone, constate que ce champignon pousse la dé-

gradation de la peptone jusqu'à l'ammoniaque par suite de la production simultanée d'acide oxalique qu'il faut neutraliser et si l'on neutralise cet acide par CO_3Ca , la dégradation s'arrête au stade aminoacide. Dans les milieux à la peptone sans sucre, les proportions respectives d'acide et d'ammoniaque formées sont celles nécessaires à la formation d'oxalate neutre d'ammoniaque, mais il y a habituellement excès d'ammoniaque dû à la présence d'autres acides résultant de la désamination des acides aminés. Les champignons qui ne produisent pas d'acide oxalique, comme les *Penicillium*, s'arrêtent au stade aminoacide et ne donnent que peu d'ammoniaque.

Comme on peut le voir d'après ces travaux, la question des variations de la réaction dans les milieux de culture est très complexe ; mais les expérimentateurs ont réussi à élucider les différents points du problème, par l'emploi de milieux simples. Dans les anciens travaux, on mesurait l'acidité totale du milieu, et certains auteurs calculaient la concentration théorique des ions H , mais les résultats étaient le plus souvent erronés à cause de l'effet tampon dont il n'était pas tenu compte dans ces calculs.

C'est surtout à partir de 1915, que, grâce aux théories et aux méthodes de Sorensen et de Clark, on a pu faire des études précises sur l'acidité réelle. Mais si l'on se contente de déterminer la concentration des ions H d'un milieu, au fur et à mesure de la culture, on est renseigné bien imparfaitement sur les qualités de ce milieu ; au contraire, en traçant les courbes de neutralisation, on obtient une image du pouvoir tampon,

c'est-à-dire de la résistance qu'offre ce milieu aux causes d'acidification et d'alcalinisation. Ce sont les variations de ce pouvoir tampon qui renseignent le mieux sur les modifications chimiques survenues.

Les méthodes colorimétriques, employées le plus souvent, et qui ne nécessitent qu'un matériel peu compliqué, donnent des résultats rapides et précis, mais, néanmoins, ne permettent pas de tracer des courbes aussi détaillées qu'avec les méthodes potentiométriques. C'est pourquoi nous avons choisi une de ces dernières pour étudier les modifications d'un milieu complexe comme le liquide de Raulin.

Recherches personnelles

Notre travail consistait donc à établir les courbes de neutralisation et de coefficient tampon de certains milieux de culture, et à suivre les variations de ces courbes au fur et à mesure que se développaient les moisissures ensemencées sur ces milieux.

LE MILIEU DE CULTURE

Après avoir employé plusieurs milieux : moût de bière ; milieu de Sabouraud liquide, à la peptone ; milieu de Hayduck à l'asparagine et au phosphate acide de potassium ; liquide de Raulin, nous avons utilisé de préférence ce dernier qui a l'avantage de présenter des tampons bien définis.

Culture des moisissures sur Raulin

Nous avons préparé le liquide de Raulin de formule classique.

Eau	1.500
Saccharose	70
Acide tartrique	4
Nitrate d'ammoniaque	4
Phosphate d'ammoniaque	0,60
Carbonate de potasse	0,60
Carbonate de magnésie	0,40
Sulfate d'ammoniaque	0,25
Sulfate de zinc	0,07
Sulfate de fer	0,07
Silicate de potasse	0,07

Nous avons employé pour cela des produits chimiquement purs, marque « Poulenc » ; puis, le liquide fut réparti dans de larges flacons spéciaux pour cultures de champignons, à raison de 200 cc. par flacon et stérilisé à l'autoclave à 115° pendant 20 minutes.

Dans les mêmes conditions, nous avons également préparé un liquide de Raulin, dans lequel l'acide tartrique fut remplacé par de l'acide citrique.

ORGANISMES ETUDIÉS

Les vases de culture furent alors ensemencés deux par deux, les uns avec *Aspergillus Niger*, les autres avec *Penicillium Glaucum*.

Nous avons, d'autre part, essayé 5 espèces de levures : *Willia Saturnus*, *Saccharomyces Pastorianus*, *Debaryomyces Matruchoti*, *Schizosaccharomyces octosporus* et *Saccharomyces Ludwigii*. Mais le liquide de Raulin n'est pas un milieu favorable pour les levures, et nous verrons plus loin que seules les trois premières se sont développées dans ce milieu.

CONDITIONS DE CULTURE

Les cultures ont été laissées à la température du laboratoire, température variant de 18 à 20°.

En ce qui concerne l'*Aspergillus* et le *Penicillium*, le développement de ces moisissures a été rapide.

Deux jours après l'ensemencement, on voit se former à la surface du liquide quelques flocons blancs qui vont en s'accroissant de jour en jour, puis, à partir du 8^e jour environ, apparaissent les conidiophores noirs pour l'*Aspergillus*, et verts pour le *Penicillium*. Enfin, à partir du 11^e jour pour le *Penicillium*, et du 14^e jour pour l'*Aspergillus*, les parties du mycélium les plus anciennes commencent à prendre une teinte jaune ver-

dâtre, l'aspect floconneux devient feutré au contraire, le liquide prend une teinte de plus en plus foncée, c'est la protéolyse qui vient succéder peu à peu au développement normal du végétal.

Nous verrons plus loin comment ces phénomènes se manifestent dans les courbes de neutralisation, mais avant, nous allons étudier la méthode employée pour la détermination du pH.

Mesure électrométrique du pH

L'établissement d'une courbe de neutralisation aussi détaillée que possible, nécessitant de nombreuses mesures de pH : 40 à 50 en moyenne, il est avantageux d'employer une méthode capable de donner des mesures rapides et précises ; la technique des électrodes d'antimoine montées en différentiel, mise au point par Vlès (1), est aujourd'hui celle qui se prête le mieux à ces mesures de pH en séries.

L'électrode d'antimoine en différentiel.

En 1925, Kolthoff et Hartong avaient établi une technique de mesure de pH en employant comme électrode l'antimoine déjà utilisé en 1923 par Uhl et Kestranek ;

(1) VLÈS et GEX. *Arch. de Phys. Biol.*, t. 8, p. 5, 5^e suppl., 1930.

mais, dans cette méthode, la variation de la force électromotrice en fonction du pH suivait une loi linéaire discontinue formée de 2 tronçons de droites non parallèles, l'un de pH1 à pH5, l'autre de pH9 à pH12, tandis que la zone de pH5 à pH9 était pratiquement inutilisable. En 1927, Vlès et Vellinger (1) réussirent à perfectionner cette méthode et à obtenir une loi linéaire unique continue dans presque toute l'étendue de l'échelle des pH, de pH1 à pH12 ; néanmoins, de nombreuses difficultés subsistaient et limitaient l'utilisation pratique de l'électrode d'antimoine ; en effet, le temps d'équilibration de la force électromotrice pouvait être assez long, et de plus l'influence de la température sur la sensibilité de l'électrode rendait les mesures délicates et peu précises.

Avec le montage en différentiel imaginé par Vlès (1), tous ces inconvénients sont supprimés ; la force électromotrice atteint son équilibre en quelques minutes et l'influence de la température devient négligeable à la température ordinaire.

La méthode consiste à mesurer la différence de potentiel entre la solution à étudier et une solution de référence de pH connu ; le pH est calculé par la formule :

$$\text{pH} = \text{AE} + \text{C}$$

C étant le pH de la solution de référence,

E le nombre de millivolts mesuré,

A la constante des électrodes.

(1) VLÈS et VELLINGER. *Arch. de Phys. Biol.*, t. 6, p. 38, 1927.

(2) VLÈS. *Arch. de Phys. Biol.*, 6, p. 92, 1927.

Cette dernière constante, théoriquement, devrait être la même pour des électrodes d'antimoine chimiquement pure, mais pratiquement, elle varie un peu, et on la détermine au début de chaque expérience, en utilisant des solutions-tampons dont le pH a été mesuré très exactement à l'électrode à hydrogène.

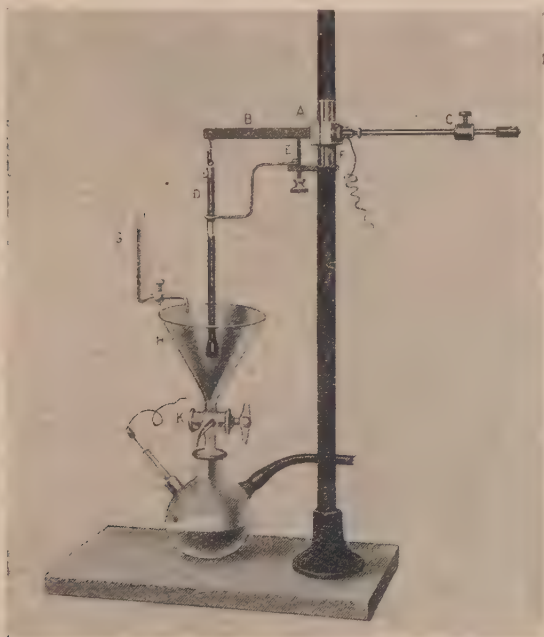
Description et montage de l'appareil.

L'appareil employé comprend deux piles montées en série. Chaque pile est constituée par un élément au calomel et un élément formé par une solution électrolytique dans laquelle plonge une électrode d'antimoine. Les éléments au calomel doivent être identiques à deux millivolts près ; les solutions électrolytiques sont dans l'une des piles la solution de référence de pH connu, dans l'autre, la solution dont on veut déterminer le pH.

L'élément au calomel de chaque pile est réalisé dans un vase spécial qui comporte deux tubulures latérales : l'une est reliée par un tube de caoutchouc à un réservoir à KCl saturé, placé sur un support, et l'autre plongeant dans le fond du vase permet la connexion électrique de l'élément.

D'autre part, ce vase inférieur communique par un robinet à trois voies à un vase supérieur ; celui-ci, destiné à recevoir la solution électrolytique dans laquelle plonge l'électrode d'antimoine, a une forme cylindrique dans l'une des piles et en entonnoir dans l'autre : la première forme convient pour la solution de référence que l'on ne change pas durant toute une série de me-

sures, et la seconde, pour la solution à étudier, parce qu'elle rend plus commodes les diverses manipulations. La liaison électrique entre l'élément au calomel et l'élément à antimoine est assurée par la solution saturée de



KCl. Le robinet à trois voies qui relie les deux vases permet aussi de mettre l'un ou l'autre en communication avec un bec déversoir.

Les électrodes sont les deux moitiés d'une même baguette d'antimoine obtenue par une préparation assez délicate qui est décrite en détail dans l'article de Mlle Gex (1). Chaque électrode est soudée avec un fil de lai-

(1) Mlle GEX. *Arch. de Phys. Biol.*, t. 9, p. 110, 1931.

ton et montée dans une gaine de verre remplie d'un compound isolant de paraffine et colophane en parties égales, de façon que la soudure laiton-antimoine soit protégée et que l'électrode dépasse seulement de 1 cm. 5 à 2 cm. Ces électrodes sont suspendues au-dessus des solutions et leurs extrémités seulement sont immergées ; mais comme il est nécessaire de soulever celle des électrodes qui plonge dans le liquide en expérience, à chaque addition d'acide ou de base, nous avons utilisé un support articulé, construit sur les indications de Monsieur le Professeur Florence, et qui augmente la rapidité et la précision des manipulations : sur une tige verticale isolante, un bras métallique bon conducteur est fixé par son milieu au moyen d'un pivot ; à l'une de ses extrémités, un crochet permet de suspendre l'électrode, tandis qu'à l'autre, se trouve une petite poignée isolante qui sert à manœuvrer l'appareil ; avant chaque série de mesures, on fixe la hauteur de l'électrode, une fois pour toutes, au moyen d'une vis de calage (Fig. page 39).

Montage en circuit.

Les piles, ainsi constituées, sont réunies entre elles par un fil de laiton fixé aux électrodes d'antimoine : l'électrode de platine de la pile qui contient la solution de pH le plus bas, dans la majorité des cas, celle qui renferme la solution de référence, est reliée à la borne — du potentiomètre, et celle de l'autre pile à la borne +.

Les mesures sont faites au moyen d'un potentiomètre Chauvin-Arnoux, et d'un galvanomètre à cadre mobile.

Réglage de l'appareil.

Ce réglage que l'on doit répéter avant chaque série de mesures comprend 3 opérations successives :

1) Réglage du potentiomètre, qui se fait en mettant en opposition l'accumulateur de 2 volts avec la pile étalon, et qui change suivant les variations de la force électromotrice de l'accumulateur.

2) Décapage des électrodes à la toile émeri n° 00, et essuyage au coton hydrophile : on reconnaît que le décapage a été suffisant lorsqu'en plaçant dans les deux piles un peu de la solution HCl N/10, on obtient une différence de potentiel égale à 0 à ± 1 millivolt près, et que ce réglage reste stable pendant quelques minutes.

3) Détermination du paramètre A : on utilise pour cela les 3 solutions-tampons suivantes exactement étalonnées à l'électrode à hydrogène :

a) Chlorure de potassium N/10 acidifié par l'acide chlorhydrique jusqu'à pH 2,3 environ.

b) Solution renfermant 12 gr. d'acide borique et 2 gr. de chlorure de sodium par litre et dont le pH est aux environs de pH5.

c) Solution de 19 gr. de borate de soude par litre dont le pH est aux environs de 9.

La solution de référence que nous avons employée est l'acide chlorhydrique N 10 étalonné au laboratoire à l'électrode à hydrogène ; cette solution est placée dans le vase cylindrique. On mesure les forces électromotrices obtenues en plaçant successivement dans le vase en entonnoir les trois solutions tampons. Ces mesures doivent être faites très soigneusement, et il faut attendre au moins 10 minutes que l'équilibre de la force électromotrice soit atteint. Avant ou après chaque introduction de liquide dans le vase en entonnoir, on observe les précautions suivantes : après avoir vidé le récipient, on le rince deux fois à l'eau distillée, puis on fait passer quelques gouttes de KCl saturé du vase inférieur dans le vase supérieur. On rince de nouveau à l'eau distillée. et on sèche au moyen d'un papier filtre. De plus, l'électrode est rincée à l'eau distillée, puis avec un peu de la solution dont on veut mesurer le pH.

Dans la position du robinet à trois voies lors des mesures, bien que la continuité hydraulique soit coupée, l'établissement du circuit électrique est assuré par une pellicule de KCl saturé persistant dans le boisseau du robinet.

Pour calculer la valeur de A, on établit un graphique en portant en ordonnées les forces électromotrices mesurées en millivolts, et en abscisses les pH de ces solutions mesurées à l'électrode à hydrogène ; on complète le graphique avec le pH de l'acide chlorhydrique N/10 de référence, qui, mis dans les deux piles, avait donné dans la deuxième partie du réglage, une force électromotrice de 0 millivolt. Si l'appareil est bien réglé, les

quatre points doivent se trouver en ligne droite à un millivolt près et l'on trouve :

$$A = \frac{\Delta \text{pH}}{\Delta E}$$

On peut alors effectuer une série de mesures pendant 5 à 6 heures sans avoir à refaire de réglage, les électrodes ne subissant pas de variations si l'on a soin de ne pas les abandonner à sec ; il suffira, à la fin de l'opération, de vérifier les deux premières parties du réglage indiquées plus haut, on aura ainsi la certitude d'avoir fait des mesures précises.

Mesure de la force électromotrice.

Pendant toute la série des mesures, le côté où se trouve l'acide chlorhydrique N/10 n'est pas touché. On fait seulement écouler chaque heure une goutte d'acide pour changer les surfaces de contact sur l'électrode. Après l'introduction de la solution à étudier, il est indispensable d'attendre 10 minutes pour obtenir une maturation des électrodes. De même, après chaque addition d'acide ou de base, dans l'établissement d'une courbe de neutralisation, il est nécessaire d'attendre un temps standard de 3 minutes pour que l'équilibre soit atteint.

Calcul du pH.

Il suffit d'appliquer la formule déjà indiquée :

$$\text{pH}_x = \text{AE} + \text{C}$$

La valeur A a été déterminée au début des mesures,

C est le pH de la solution de référence;

E la force électromotrice que l'on vient de mesurer.

Courbe de neutralisation.

Elle consiste à représenter le pH que suit une quantité fixe de solution à laquelle on fait des additions progressives d'acide ou de base. Avant chaque addition de ces réactifs, on soulève l'électrode d'antimoine au-dessus du vase en entonnoir, puis, après avoir mesuré le réactif, on homogénéise le liquide par agitation avec une baguette de verre qu'on laisse dans le vase pendant toute la durée de l'opération. L'électrode étant redescendue dans le liquide, on mesure la force électromotrice au bout de 3 minutes et on calcule le pH.

En ordonnées, on porte les quantités de réactif ajoutées successivement, et en abscisses les valeurs de pH qui correspondent. On obtient ainsi une courbe irrég-

gulière montrant qu'à certaines zones de pH la solution offre une certaine résistance aux causes d'acidification ou d'alcalinisation ; c'est l'effet tampon.

Courbe de pouvoir tampon.

Elle met davantage en évidence les irrégularités de la courbe précédente d'après laquelle elle est établie. Le coefficient tampon représente pour une solution donnée la plus ou moins grande difficulté qu'a cette solution à suivre les variations de pH ; ce coefficient est donné par la formule suivante :

$$t = \frac{\frac{\Delta q}{\Delta \text{pH}}}{V}$$

Δq étant la quantité d'acide ou de base ajoutée à un litre de solution pour produire une variation de pH égale à ΔpH ; mais ces additions de réactifs augmentent peu à peu le volume de la solution ; on en tient compte en divisant par V qui exprime le volume moyen qu'a cette solution lorsqu'elle se trouve au pH moyen pour lequel on calcule t .

Nous avons opéré dans toutes nos expériences avec 20 cc. de solution, des solutions titrées N/10 HCl ou NaOH, et le coefficient tampon a été calculé pour des variations de pH 0,25.

Technique employée

Les mesures pratiquées tout d'abord sur le liquide stérilisé non ensemencé, ont été renouvelées au fur et à mesure du développement des moisissures, tous les deux jours en moyenne. Après quelques essais, nous avons adopté pour toutes nos courbes de neutralisation le mode opératoire suivant : le liquide est, au préalable, agité très doucement en évitant avec beaucoup de soin de détériorer ou de noyer le voile mycélien ; cette homogénéisation est nécessaire, car le liquide n'a pas la même composition en surface qu'en profondeur, le champignon ne poussant pas uniformément réparti dans le liquide. Cette précaution étant prise 5 cc. de liquide sont prélevés aseptiquement et dilués jusqu'à 20 cc. avec de l'eau distillée très pure : cette dilution est alors placée dans le vase à entonnoir de l'appareil à électrodes d'antimoine, dont le réglage a été fait rigoureusement comme nous l'avons décrit plus haut.

Après mesure du pH initial, on ajoute de la soude N/10 par additions successives de 0 cc. 05 après chacune desquelles le pH est mesuré, en observant les précautions indiquées.

Cette méthode, relativement rapide, nous a permis d'établir des courbes de neutralisation assez détaillées

comprenant une série de 40 à 50 valeurs de pH, chaque courbe demandant un travail de 4 à 5 heures, réglage de l'appareil compris.

Courbe de neutralisation et courbe de pouvoir-tampon du liquide de Raulin

Le liquide de Raulin comporte un certain nombre de tampons qui se traduisent dans la courbe de neutralisation et dans la courbe de coefficient tampon par des bandes correspondant aux différents pK des constituants.

Le pH initial du liquide de Raulin est de 3,70. Entre pH4 et pH4,5, on voit une bande très nette correspondant à la dissociation de la 2^e valence de l'acide tartrique, puis la courbe du coefficient tampon descend progressivement et entre pH6 et pH6,75 le milieu n'est pas stabilisé, mais vers pH7, une bande très accusée se dessine qui semble correspondre à la 2^e valence de l'acide phosphorique ; enfin, la courbe remonte vers pH9 par le fait du déplacement de l'ammoniaque des sels ammoniacaux par la soude de titration, ce déplacement s'effectue peu à peu depuis pH 7,5, avec effet tampon plus marqué à pH 9,25.

Mais si, à première vue, on est tenté d'attribuer au phosphate le tampon qui se dessine entre pH 7 et pH 7,5, on doit reconnaître, en examinant la formule du liquide de Raulin, que la faible quantité de phosphate d'ammoniaque contenue dans ce milieu, n'est pas en rapport avec l'importance du tampon qui se manifeste sur la courbe de neutralisation.

C'est pourquoi, partant de l'eau distillée, nous avons établi les courbes de neutralisation des solutions obtenues en ajoutant successivement les différents constituants du liquide de Raulin. L'eau distillée, dont le pH initial était de 6,70 a donné une courbe qui, par addition de quelques centièmes de centimètres cubes de NaOH N/10, allait directement jusqu'à pH 11, et avec HCl N/10 jusqu'à pH 2,5.

Le saccharose ajouté n'a pas modifié sensiblement cette courbe. Mais avec l'acide tartrique, acide alcool bibasique dont les pK sont respectivement 3,01 et 4,35, nous avons obtenu une courbe (fig. 1) de pH initial 3,65 avec effet tampon bien marqué entre pH 4 et pH 4,5, puis descente progressive jusqu'à pH 6 et à pH 7,35 une bande presque aussi marquée que dans la courbe obtenue avec le liquide de Raulin ; ce tampon doit donc être attribué à l'acide tartrique. Un essai effectué avec une solution d'acide tartrique pur N/100 et neutralisation par la soude N/10 a donné exactement les mêmes résultats.

Les autres constituants modifient assez peu l'allure générale de la courbe ; les sels ammoniacaux, toutefois, créent un tampon qui va de pH 7,5 à pH 11 avec maximum à pH 9,25. Le phosphate qui se trouve en

faible proportion renforce les tampons vers pH 4,25, pH7, et pH9, points qui correspondent aux pK des 3 valences de l'acide phosphorique. Les sulfates et car-

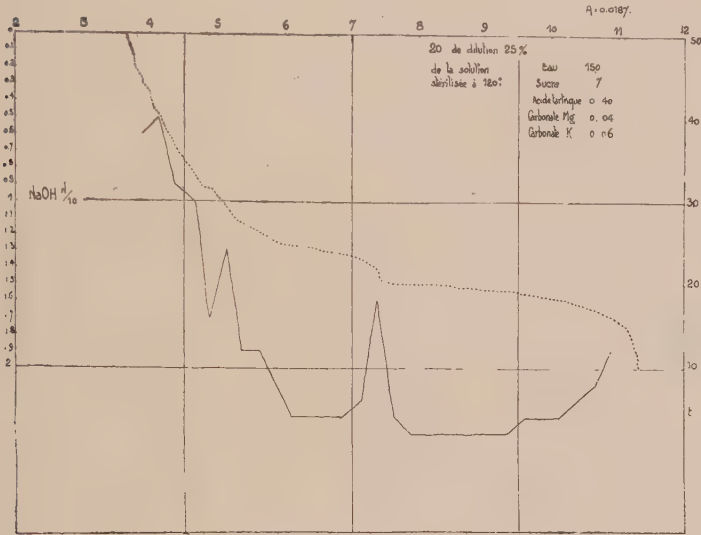


FIG. 1

bonates n'apportent pas de modifications appréciables. Il sera donc possible de suivre surtout les variations concernant l'acide tartrique, le nitrate d'ammoniaque et le phosphate d'ammoniaque.

Aspergillus Niger sur liquide de Raulin tartrique.

(Fig. 2 et 3).

Une courbe pratiquée sur le milieu de culture au 9^e jour après l'ensemencement, au moment du plein développement du voile mycélien et avant la formation

des spores, montre un pH initial inchangé, mais une forte diminution du pouvoir tampon dans la zone acide et augmentation dans la zone alcaline ; il y a donc tendance nette à l'alcalinisation.

D'autre part, la bande très nette que l'on observait à pH 7,25 a notablement diminué et son maximum est

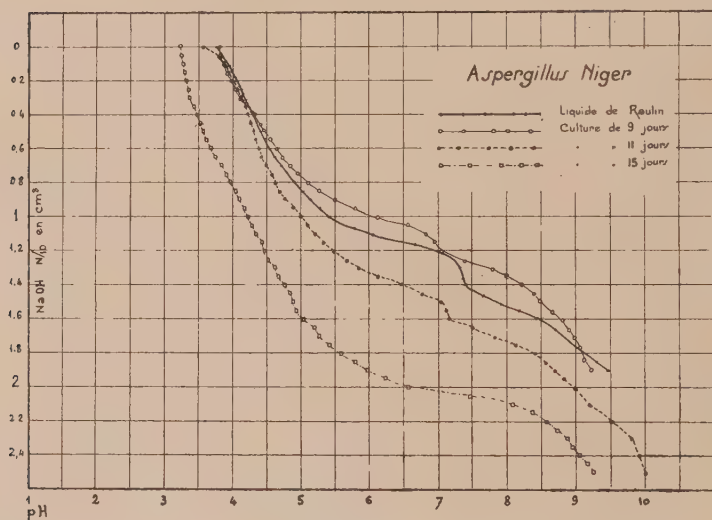


FIG. 2

reporté vers 6,87. Cela correspond vraisemblablement à la combustion de l'acide tartrique et à l'assimilation de l'ion nitrique du nitrate d'ammoniaque entraînant l'augmentation du tampon vers 9,25. Ces phénomènes sont d'ailleurs très passagers, quarante huit heures après, c'est-à-dire au 11^e jour de culture, le liquide s'est franchement enrichi en acides.

L'*Aspergillus* qui trouvait son aliment carboné dans la molécule des acides organiques et son aliment azoté

dans l'ion nitrique, utilise au contraire, maintenant, d'une part le sucre et d'autre part l'ion ammoniacal, il en résulte un renversement des phénomènes précédents ; on trouve, en effet, les tampons caractéristiques des acides résultant de la combustion incomplète du sucre ; vers pH 4,25 celui de la 2^e valence de l'acide oxalique, vers pH 4,75 celui de l'acide acétique, vers

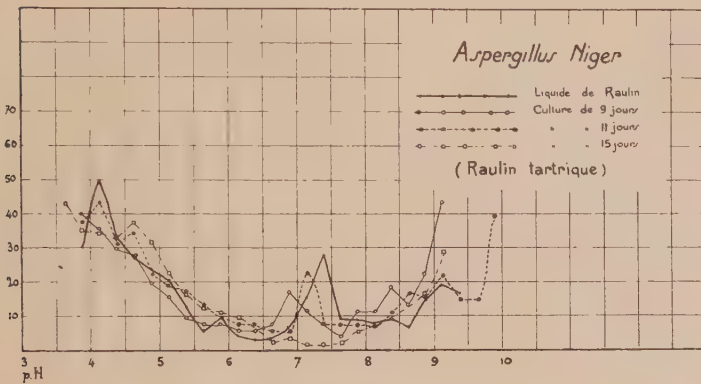


FIG. 3

pH 5,6 celui de l'acide malonique. L'ammoniaque diminue et le tampon est moins accentué vers pH9.

Enfin, dans la 4^e courbe faite au 15^e jour de culture, l'acidité est encore augmentée. Le pH initial a passé à 3,2. Le milieu est fortement tamponné dans la zone de pH 3,5 à pH6 correspondant aux acides qui proviennent du sucre, et les tampons de l'acide tartrique et du phosphate ont disparu ; mais la protéolyse ayant commencé, l'ammoniaque se reforme et remonte le coefficient tampon dans la zone de pH9. Ces phénomènes sont surtout visibles sur les courbes de coefficient tampon de la figure 3.

Penicillium glaucum sur liquide de Raulin tartrique.

(Fig. 4 et 5).

L'évolution de la croissance du *Penicillium glaucum* offre un caractère tout différent. On ne trouve pas, comme pour l'*Aspergillus Niger*, un début d'alcalini-

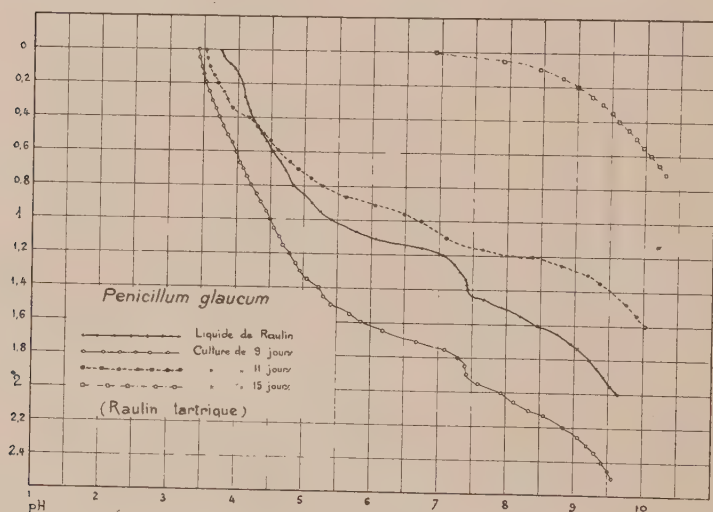


FIG. 4

sation ; le liquide s'acidifie tout de suite et l'on peut voir que la courbe au 9^e jour de culture est franchement décalée vers l'acidité ; les tampons correspondant aux pK de l'acide tartrique et du phosphate ont diminué. Le *Penicillium* attaque donc vraisemblablement l'ion ammoniacal du nitrate d'ammoniaque d'où il résulte cette acidification très nette ; d'autre part, l'assi-

milation de l'acide tartrique qui devrait aboutir à une diminution du pouvoir tampon dans la zone acide est accompagnée d'une assimilation du sucre qui aboutit à la mise en liberté d'acides organiques ; c'est pourquoi la courbe de coefficient tampon indique non pas une diminution, mais une modification de ce pouvoir tampon. La courbe du 11^e jour indique une diminu-

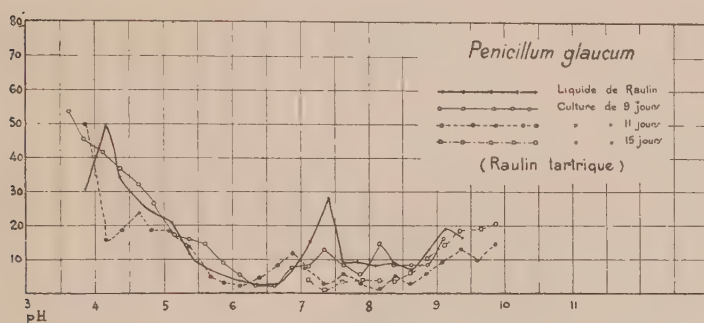


FIG. 5

tion des acides organiques et de l'ammoniaque qui continuent à servir d'aliments au champignon ; mais le milieu est presque épuisé, la protéolyse commence et le liquide s'alcalinise de plus en plus : En effet, au 15^e jour, le pH initial de la courbe est à 6,85.

Une seconde série d'expériences prolongée plus longtemps a donné les mêmes résultats, le *Penicillium* provoquant, en définitive, une alcalinisation beaucoup plus rapide et plus importante que l'*Aspergillus*.

Enfin, une troisième série d'expériences a été schématisée dans le tableau suivant (fig. 6), où sont indiqués en abscisses les jours de prélèvement, et en ordonnées le nombre de centimètres cubes de NaOH N/10

nécessaires pour amener les milieux à des pH déterminés. On se rend ainsi très nettement compte des

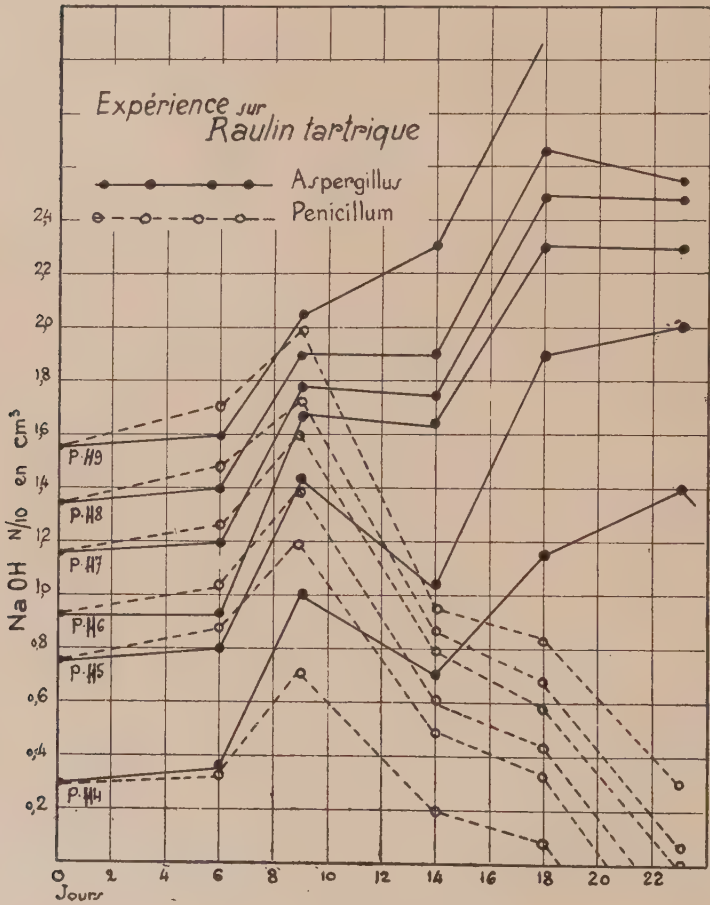


FIG. 6

différences d'évolution du milieu de culture sous l'influence de la nutrition des deux espèces de champignons.

Liquide de Raulin citrique.

Ce liquide préparé dans les mêmes conditions que le précédent, mais en remplaçant l'acide tartrique par son équivalent d'acide citrique, nous a donné une

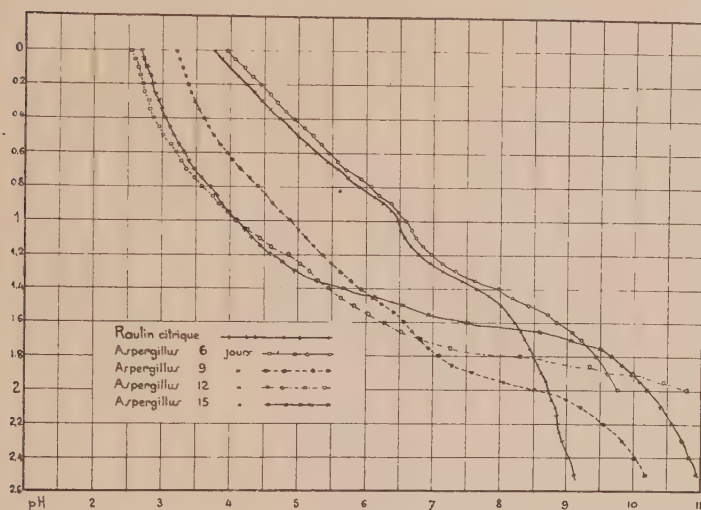


FIG. 7

courbe de neutralisation qui caractérise bien la différence existant entre ces deux liquides ; l'acide citrique est un alcool acide tribasique dont les valences ont les pK suivants : 3,08 pour la 1^e, 4,49 pour la 2^e et 6,15 pour la 3^e. Les deux premiers ont donc des valeurs très voisines de celles des pK de l'acide tartrique, quant au troisième, il se trouve très bien représenté sur la courbe (fig. 7 et 8) entre pH 6 et pH 6,5, mais l'on retrouve,

entre pH 6,75 et pH 7,25, un tampon très marqué qui semble correspondre à celui de l'acide phosphorique, mais qui, en réalité, est produit par l'acide citrique ; cela avait lieu déjà pour l'acide tartrique, comme nous l'avons montré plus haut, et nous avons vérifié l'exactitude de la courbe en établissant celle d'une solution d'acide citrique pur.

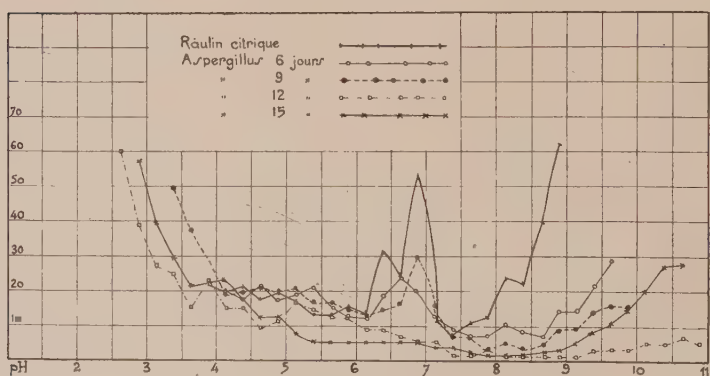


FIG. 8

Aspergillus Niger sur Raulin citrique.

(Fig. 7 et 8).

L'évolution a eu lieu comme sur le Raulin tartrique, mais plus rapidement. En effet, dès le 6^e jour, le pH initial a passé de 3,75 à 3,95, le milieu est légèrement alcalinisé, et les tampons de l'acide citrique ont diminué ; le champignon consomme donc l'ion nitrique et l'acide citrique, mais ces deux causes d'alcalinisation sont bientôt dominées par des causes d'acidification

qui se manifestent en même temps ; on voit, en effet, que le tampon de l'ammoniaque vers pH9 a sensiblement diminué. C'est pourquoi le 9^e jour, le pH initial a diminué et se trouve à 3,25, le tampon de l'ammoniaque a encore baissé, et, au 12^e jour, l'acidification a atteint son maximum et l'assimilation de l'ion ammoniacal semble complète. A partir de ce moment, la réaction s'inverse de nouveau, le champignon prend sa nourriture parmi les produits qui restent dans le milieu épuisé, c'est-à-dire les acides organiques et l'ion nitrique du nitrate d'ammoniaque, puis la protéolyse commence, d'où il résulte une alcalinisation et une diminution du pouvoir tampon, comme on le voit dans la courbe du 15^e jour de culture.

Penicillium glaucum sur Raulin citrique.

(Fig. 9 et 10).

L'attaque de l'ion ammoniacal, dès le début de la culture, se manifeste très nettement dans la courbe du 6^e jour ; il y a une acidification nette et diminution rapide du tampon de pH8 à pH9, l'acide citrique est aussi attaqué, mais la diminution du tampon dans la zone de pH 3,75 à pH6 qui doit avoir lieu normalement est masquée par l'accumulation des acides provenant du sucre. Les autres courbes indiquent un épuisement rapide du milieu accompagné d'une forte alcalinisation puisqu'au 15^e jour le pH initial est à 6,60.

Nous avons représenté ces deux expériences sur Raulin citrique dans la figure 11. Au début des cul-

tures, lorsque ces champignons sont placés dans un milieu neuf, ils ont le moyen de se défendre contre

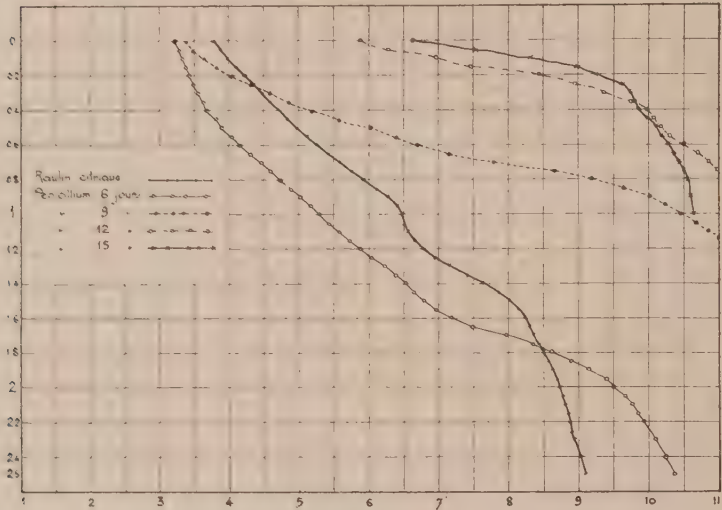


FIG. 9

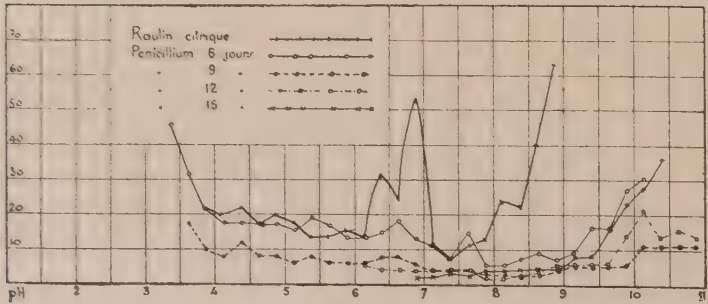


FIG. 10

les variations de pH qui deviendraient dangereuses par une trop grande amplitude ; mais, à mesure que le milieu s'épuise, il y a prédominance de l'alcalinisa-

tion pour le *Penicillium* et de l'acidification pour l'*Aspergillus*, puis l'alcalinisation due à la protéolyse se manifeste pour les deux espèces, mais beaucoup plus rapide et plus importante pour le *Penicillium*.

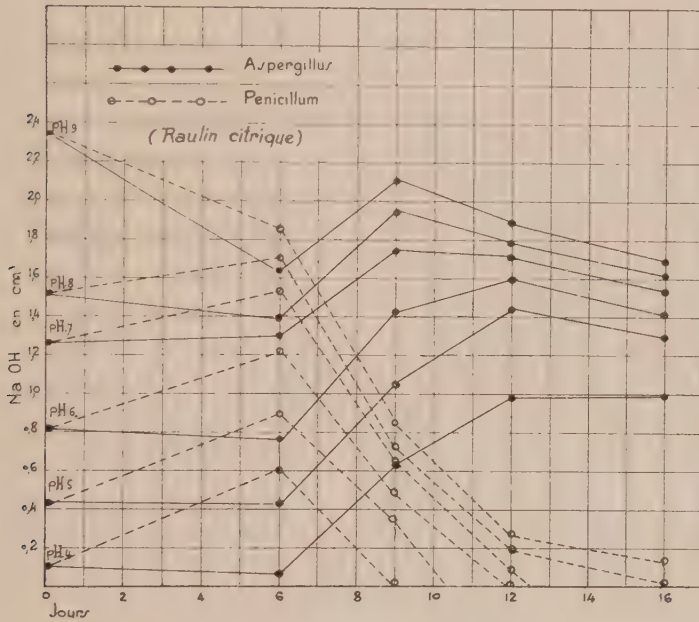


FIG. 11

L'*Aspergillus*, en effet, accumule de l'acide oxalique inassimilable par la suite, tandis que le *Penicillium* qui ne produit pas d'acide oxalique, utilise les acides qui proviennent de la combustion incomplète du sucre lorsque celui-ci a disparu.

Levures sur liquide de Raulin.

(Fig. 12, 13 et 14).

Les mêmes expériences ont été pratiquées avec des levures pures ; nous représentons les courbes obtenues avec trois sortes de levures : *Willia Saturnus*,

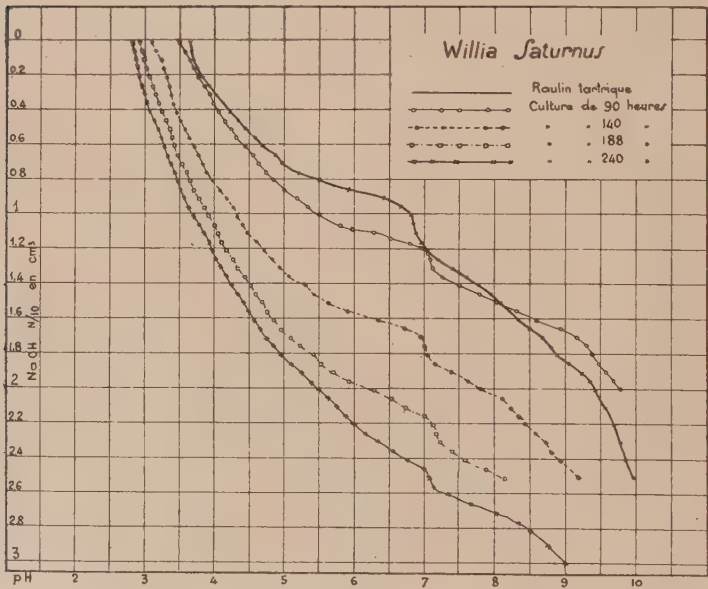


FIG. 12

Saccharomyces Pastorianus et *Debaryomyces Matru-*
choti. Ces levures se sont développées assez rapidè-
ment. Pour les prises d'essai, comme il n'était pas
possible de prélever directement un liquide pur sans

entraîner une certaine quantité de levure, nous avons prélevé chaque fois 10 centimètres cubes de milieu, puis centrifugé et mesuré 5 centimètres cubes de liquide clair qui, dilués ensuite à 20 cm³ avec de l'eau distillée, servaient à l'établissement des courbes.

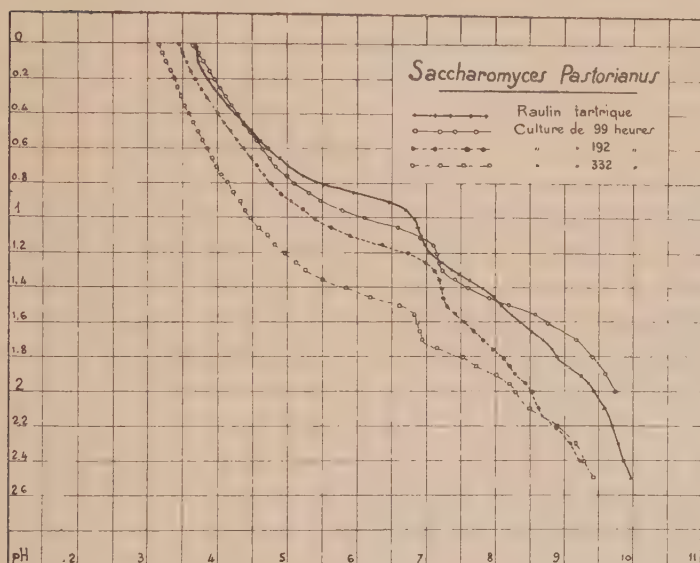


FIG. 13

Les 3 sortes de levures utilisent le milieu de la même façon : attaque du sucre et de l'ion ammoniacal, tandis que l'acide tartrique est respecté. Il n'y a que des différences dans la rapidité des variations de la réaction qui correspondent aux différences de rapidité de la croissance. Tandis que le *Willia Saturnus* acidifie

très rapidement le milieu cent heures après l'ensemencement, le *Saccharomyces Pastorianus* évolue

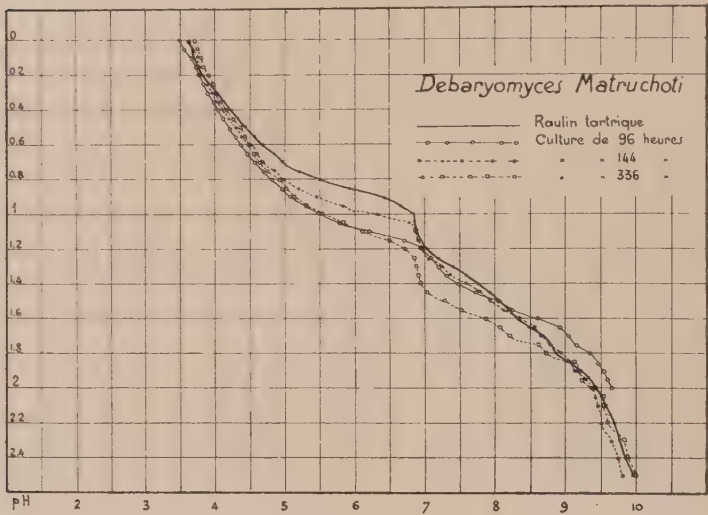


FIG. 14

d'une façon beaucoup plus régulière, le *Debaryomyces Matruchoti*, par contre, n'agit que d'une façon insignifiante.

CONCLUSIONS

I. — Les phénomènes d'alcalinisation et d'acidification des milieux de culture ont été depuis longtemps étudiés d'une façon méthodique, et leur mécanisme démontré grâce à l'emploi de milieux chimiques simples.

II. — Les causes d'acidification les plus générales résident, d'une part, dans l'assimilation de l'ion ammoniacal des sels ammoniacaux avec libération des acides correspondants, et, d'autre part, dans la production d'acides organiques fixes au cours de la combustion incomplète des sucres.

Les causes d'alcalinisation les plus générales sont d'abord la consommation des molécules organiques assimilables, et ensuite, la formation d'ammoniaque au cours de la protéolyse.

III. — Nous avons montré l'intérêt et la sensibilité d'une technique qui permet de mettre ces phénomènes

en évidence même dans un milieu chimique complexe comme le liquide de Raulin.

IV. — L'*Aspergillus Niger* et le *Penicillium glaucum* n'attaquent pas de la même façon les éléments du liquide de Raulin. Le premier aboutit à une acidification intense, due surtout à l'accumulation de l'acide oxalique ; l'autre, au contraire, aboutit rapidement à l'alcalinisation où la protéolyse joue le rôle principal.

V. — Dans un milieu complexe et riche en substances-tampons, il y a, au début des cultures, une sorte d'équilibre des causes d'alcalinisation et d'acidification ; et l'on assiste à des renversements de réaction, comme si le végétal cherchait à lutter contre une variation de pH de trop grande amplitude.

Vu :

Le Doyen,

J. LÉPINE

Le Président de la Thèse,

G. FLORENCE.

Vu et permis d'imprimer :

LYON, le 5 Juin 1934.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,

A. LIRONDELLE.

BIBLIOGRAPHIE

- AUERBACH et SMOLCZYK. — Zur Theorie und Praxis der electrometrischen Sauretitration. *Z. f. phys. chem.*, t. 110, Akademische Verlagsgesellschaft Leipzig, 1924.
- BACH (D.). — Sur la toxicité et la valeur alimentaire de l'acétate d'ammoniaque pour les champignons inférieurs. *C. R. Ac. Sc.*, (1924), t. 179, p. 108.
- Variations de la concentration des ions H au cours de l'assimilation des sels ammoniacaux d'acides forts par l'*Aspergillus Repens* de Bary. *C. R. Ac. Sc.*, (1924), t. 179, p. 1085.
- Valeur alimentaire des sels ammoniacaux pour l'*Aspergillus Repens* de Bary. *C. R. Ac. Sc.*, (1924), t. 179, p. 1190.
- Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus Repens* de Bary. *Thèse de Doctorat ès-Sciences*, Paris, 1925.
- BERNHAEUER. — Sur la formation d'acides par *Aspergillus Niger*. Communication préliminaire. *Bioch. Zeits.*, (1924), t. 153, p. 517.

- Généralités et méthode pour l'étude des processus de formation d'acides. *Bioch. Zeits.*, (1926), t. 172, p. 296.
 - La formation de l'acide gluconique. *Bioch. Zeits.*, (1926), t. 172, p. 313.
 - Les conditions de formation d'acide citrique. *Bioch. Zeits.*, (1926), t. 172, p. 324.
- BJERRUM. — Die theorie der alkalimetrischen und azidimetrischen Titrierungen. Sammlung keimster und chemisch-technischer Vortrage, t. 21, Enke, Stuttgart, 1914.
- BOAS und LEBERLE. — Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen. *Bioch. Zeits.*, (1919), t. 92, p. 170.
- BUTKEWITSCH (W.). — Sur la formation d'acide oxalique et d'ammoniaque dans la culture d'*Aspergillus Niger* sur peptone. *Bioch. Zeits.*, (1922), t. 129, p. 445.
- Sur la formation d'acides chez les champignons. *Bioch. Zeits.*, (1927), t. 182, p. 99.
- CHALLENGER (F.), SUBRAMANIAN (V.), et WALKER (T.K.). — Le mécanisme de la formation des acides citrique et oxalique à partir des sucres par l'*Aspergillus Niger*. *Chem. Soc.*, (1927), t. 131, pp. 200-208. *Chem. Soc.*, (1927), t. 131, pp. 3044-3054.
- CLARK (J.-F.). — On the toxic effect of deleterious agents on the germination and development of certain filamentous fungi. *Bot. Gazette*, (1899), t. 28, pp. 289 et 378.

CLUZET, ROCHAIX et KOFMAN. — Concentrations optima et concentrations limites en-ions hydrogène des cultures microbiennes. Variations produites par les microbes vers les concentrations optima. *C. R. Ac. Sc.*, (1924), t. 178, p. 1638.

GEX (M.). — *Archives de Physique Biologique*, (1931), t. 9, p. 110.

KAHLENBERG (L.) et TRUE (R.). — On the toxic action of dissolved salts and their electrolytic dissociation. *Bol. Gazette*, (1896), t. 22, p. 81.

KIESEL (A.). — Sur l'action de divers acides et sels acides sur le développement de l'*Aspergillus Niger*. *Ann. Inst. Pasteur*, (1913), t. 27, p. 391.

MAY (E.), HERRICK (H.T.), THOM (C.) et CHURCH (M.B.). — Production d'acide gluconique par le groupe *Penicillium luteum purpurogenum*. *Jour. of Biol. chem.*, (1927), t. 75, p. 417.

MICHAELIS (L.). — *Physico-chimie*, Masson, 1923.

MOLLIARD (M.). — Production d'acide citrique par le *Sterigmatocystis Nigra*. *C. R. Ac. Sc.*, (1919), t. 168, p. 360.

— Sur la signification physiologique de l'acide oxalique. *C. R. Soc. Biol.*, (1919), t. 82, p. 351.

— Influence de la nature des sucres sur la formation d'acides organiques par le *Sterigmatocystis nigra* sur milieux déséquilibrés. *C. R. Soc. Biol.*, (1924), t. 90, p. 1395.

TANRET (C.). — Action des nitrate, sulfate, chlorhydrate et phosphate d'ammoniaque sur l'*Aspergillus Niger*. *Bull. Soc. chim.* t. 17, pp. 914, 1896.

VELLINGER. — Note sur l'électrode d'antimoine. *Arch. de Physique Biologique*, (1928), t. 7, n° 1, p. 39.

VLÈS (F.) et VELLINGER. — Notes préliminaires sur l'électrode d'antimoine. Les propriétés fondamentales. *Arch. de Physique Biologique*, (1927), t. 6, n° 1, p. 38.

VLÈS (F.) et GEX (M.). — *Arch. de Physique Biologique*, (1930), t. 8, 5° supplément, p. 5.

VLÈS (F.). — Notes sur l'électrode d'antimoine. Montage pratique en différentiel. *Arch. de Physique Biologique*, (1927), t. 6, n° 2, p. 92.

— *Précis de chimie physique*, Vigot, 1929.

WEHMER (C.). — Formation d'acide citrique à partir de l'acide glyconique par action des moisissures. *D. Ch. G.*, (1927), t. 58, p. 2618.

Table des Matières

AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	11
HISTORIQUE. <i>Etude des variations de la réaction des milieux de culture</i>	15
I. Causes d'acidification	19
II. Causes d'alcalinisation	26
RECHERCHES PERSONNELLES	33
<i>Culture des moisissures sur Raulin</i>	34
<i>Mesure électrique du pH</i>	36
Description et Montage de l'appareil	38
Réglage de l'appareil	41
Mesure de la force électro-motrice	43

Calcul du pH — Courbe de neutralisation ..	44
Courbe de pouvoir tampon	45
<i>Technique employée</i>	46
<i>Courbe de neutralisation et de pouvoir tampon</i> <i>du liquide de Raulin</i>	47
Aspergillus Niger sur Raulin tartrique ..	49
Penicillium glaucum sur Raulin tartrique	52
Liquide de Raulin citrique	55
Aspergillus Niger sur Raulin citrique	56
Penicillium glaucum sur Raulin citrique ..	57
Levures sur liquide de Raulin	60
 CONCLUSIONS	 63
 BIBLIOGRAPHIE	 65

